

University of Groningen

**Cellulaire membranen en membraangebonden enzymen bij vitamine E gebrek. Een morfologisch, cytochemisch en biochemisch onderzoek van de eendelever**

Hulstaert, Ceasar Emmanuel

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
1974

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Hulstaert, C. E. (1974). Cellulaire membranen en membraangebonden enzymen bij vitamine E gebrek. Een morfologisch, cytochemisch en biochemisch onderzoek van de eendelever. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## 7 SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt verslag gedaan van een morfologisch, cytochemisch en biochemisch onderzoek van een aantal cellulaire membranen in de leverparenchymcel van de Peking eend bij vitamine E gebrek.

In hoofdstuk 1 worden de bij eerder onderzoek gevonden veranderingen in de membraan behandeld waaronder het verlies aan positief membraankontrast en de afname van het percentage meervoudig onverzadigde vetzuren. Mede op grond van nieuwe inzichten over de opbouw van membranen wordt aangegeven waarom het wenselijk is bij vitamine E gebrek aandacht te schenken aan de eiwitcomponent in de membraan.

Hoofdstuk 2 bevat een overzicht van de voor het onderzoek belangrijke literatuur over membranen, over vitamine E en over de celbiologische verschijnselen bij vitamine E gebrek. In dit hoofdstuk wordt tevens een overzicht gegeven van de voornaamste membraanmodellen en wordt nader ingegaan op de belangrijkste hypothesen over de biologische werking van vitamine E.

In hoofdstuk 3 wordt de vraag of *vitamine E gebrek naast veranderingen in de membraanlipiden, ook veranderingen in de membraaneiwwitten tot gevolg heeft* nader uitgewerkt.

i. Is er een verschil waar te nemen in de ultrastructuur van membranen in de leverparenchymcellen van controle en vitamine E deficiënte eenden na fixatie met een speciale methode voor het conserveren van membraaneiwwitten? ii. Heeft vitamine E gebrek invloed op de afmetingen van de leverparenchymcel en zijn organellen? iii. Welke enzymen in de lever worden bij vitamine E gebrek beïnvloed en wat kan de betekenis daarvan zijn voor het functioneren van de leverparenchymcel? Daar in een vooronderzoek vooral de aandacht viel op 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase komen ook nog de volgende vragen aan de orde: a) is de cytochemische lokalisa-tie van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase in de levers van controle en vitamine E deficiënte eenden identiek? b) is er biochemisch een verschil waar te nemen in de aktiviteit van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase

in de levers van controle en vitamine E deficiënte eenden? c) gaat de bij vitamine E gebrek gevonden verandering van de activiteit van de in de plasmamembraan langs de galkapillair gelokaliseerde 5'-nucleotidase gepaard met veranderingen in de samenstelling van de over deze membraan getransporteerde gal? iv. Zijn de veranderingen in de activiteit van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase toe te schrijven aan een veranderde hoeveelheid enzym of aan een verandering van de milieuomstandigheden in de membraan? v. In hoeverre ondersteunen onze resultaten de hypothesen over de biologische werking van vitamine E?

Nadat in hoofdstuk 4 de in het onderzoek gebruikte materialen en methoden zijn beschreven worden in hoofdstuk 5 de resultaten van het onderzoek in 3 afzonderlijke delen gepresenteerd: een morfologisch, een enzym-histochemisch en cytochemisch en een biochemisch gedeelte. Elk deel wordt besloten met een discussie over de technische aspecten alsmede over die aspecten die niet op vitamine E gebrek betrekking hebben.

De morfologische resultaten kunnen als volgt worden samengevat. In lichtmikroskopische coupes van de levers van vitamine E deficiënte eenden werd een groter aantal vetvakuolen gevonden en was de hoeveelheid glycogeen minder dan bij controle eenden. Tevens werd een toename van kleine lichtgekleurde cellen waargenomen die tussen de leverparenchymcellen liggen en op elektronenmikrofoto's de indruk gaven mogelijk van lymfocytair aard te zijn. Bij toepassing van een speciale fixatiemethode voor het conserveren van membraaneiwitten werd een ultrastructureel celbeeld verkregen, waarbij het cytoplasma positief gekontrasteerd was en de membranen ongekontrasteerd waren. De mitochondriale binnen- en buitenmembraan waren vrijwel nooit gescheiden waar te nemen; de membranen die de cristae vormen waren wel gescheiden waar te nemen. Op cellulair- en organelniveau werden bij toepassing van deze fixatiemethode geen verschillen gevonden tussen leverparenchymcellen van controle en vitamine E deficiënte eenden; de dikte van membranen en de diameter van eiwitpartikels in membranen bleken echter wel te verschillen. De dikte van de mitochondriale buitenmembraan was bij vitamine E gebrek afgenomen, die van de binnenmembraan was gelijk gebleven, die van de membraan van het ruwe endoplasmatische retikulum was toegenomen en de dikte van de plasmamembraan was gelijk gebleven. De diameter van de eiwitpartikels bleek alleen in de mitochondriale membraan te zijn afgenomen. Het volume van de leverparenchymcel en zijn organellen werd morfometrisch bepaald in routine-gefixeerd weefsel. Bij vitamine E gebrek bleek het volume van de leverparenchymcel 30 % groter te zijn geworden. Dit

c) gaat de bij  
it van de in de  
5'-nucleotidase  
ver deze mem-  
e aktiviteit van  
een veranderde  
omstandigheden  
taten de hypo-

erialen en me-  
van het onder-  
ch, een enzym-  
eelte. Elk deel  
ekten alsmede  
hebben.

amengevat. In  
deficiënte een-  
de hoeveelheid  
n toename van  
verparenchym-  
n mogelijk van  
fixatiemethode  
struktureel cel-  
teerd was en de  
innen- en bui-  
en; de membra-  
men. Op cellu-  
emethode geen  
trole en vitam-  
meter van eiwit-  
De dikte van de  
ek afgenomen,  
de membraan  
en en de dikte  
r van de eiwit-  
ijn afgenomen.  
verd morfome-  
E gebrek bleek  
geworden. Dit

grotere volume berustte op een toegenomen volume van de vetvakuolen en van de cytoplasmatische matrix.

Bij vitamine E gebrek bleken histochemisch zes enzymen in de lever gestimuleerd te zijn : 5'-nucleotidase, glucose-6-fosfatase, NADP- afhankelijk isocitroenzuurdehydrogenase, NADH- en NADPH-tetrazolium-reductase, en melkzuurdehydrogenase. Al deze aangetoonde enzymen zijn membraangebonden. Cytochemisch werd aangetoond dat de ultrastrukturele lokalisatie van 5'-nucleotidase (gelokaliseerd aan de lumenzijde van de plasmamembraan langs de galkapillairen) en glucose-6-fosfatase (gelokaliseerd in de membranen van het ruwe endoplasmatische retikulum en van de kernmembraan) in de levers van vitamine E deficiënte eenden identiek is aan die bij controle eenden.

De biochemische bepaling van de aktiviteit van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase in leverhomogenaten van controle en vitamine E deficiënte eenden gaf eveneens een verhoging van de aktiviteit van deze enzymen bij vitamine E gebrek te zien. De toename van de aktiviteit was het grootst per mg DNA: voor 5'-nucleotidase 49 % en voor glucose-6-fosfatase 46 %. De toename van de aktiviteit per mg eiwit, per mg fosfolipide en per mg RNA bedroeg voor 5'-nucleotidase respectievelijk 24, 27 en 18 % en voor glucose-6-fosfatase 18, 30 en 25 %. Bij preïnkubatie van het homogenaat met het detergens digitonine was de procentuele toename voor beide enzymen bij controle en vitamine E deficiënte eenden gelijk. Voorts bleek bij vitamine E gebrek per gewichtseenheid DNA de gewichtshoeveelheid RNA, eiwit en fosfolipide te zijn toegenomen. Bij analyse van de gal van vitamine E deficiënte eenden bleek het fosfolipide-gehalte 3 maal zo hoog te zijn dan bij controle eenden.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten bediscussieerd aan de hand van de in hoofdstuk 3 gestelde vragen. i. De afgenomen dikte van de mitochondriale buitenmembraan wordt geacht veroorzaakt te zijn doordat de daarin gelokaliseerde eiwitpartikels door de aktiviteit van vrije radicalen kleiner zijn geworden. De toename van de dikte van de membraan van het ruwe endoplasmatische retikulum werd toegeschreven aan een toename van het aantal enzymmolekulen in de membraan. ii. De toename van het volume van de vetvakuolen en van de cytoplasmatische matrix, die berusten op een toename van de hoeveelheid eiwit, fosfolipide en RNA in de leverparenchymcel, moeten waarschijnlijk gezien worden als algemeen optredende reacties van de leverparenchymcel bij vitamine E gebrek daar zij ook bij de rat voorkomen. iii. De aktiviteit van de cytoplasmatisch gelokaliseerde enzymen is per leverparenchymcel en per celorganel aan-

zienlijk toegenomen. Ondanks de veranderingen in de membraan is de ultrastructurele lokalisatie van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase niet veranderd. Over de celbiologische betekenis van de toename van de activiteit werd het volgende opgemerkt. De toename van NADP-afhankelijk isocitroenzuurdehydrogenase hangt mogelijk samen met de behoefte aan NADPH; deze verbinding is van belang bij de vetzuursynthese. De toename van glucose-6-fosfatase houdt waarschijnlijk verband met een stagnering in de energievoorziening evenals de toename van melkzuurdehydrogenase. De toename van 5'-nucleotidase gaat gepaard met een toename van de fosfolipidenconcentratie in de gal en hangt mogelijk samen met de terugresorptie van met de gal uitgescheiden nucleotiden. De toename van de fosfolipidenconcentratie in de gal houdt verband met een toegenomen membraanafbraak niet alleen in leverparenchymcellen maar ook in andere weefsels in het lichaam. iv. De toename van de activiteit van 5'-nucleotidase en glucose-6-fosfatase berust waarschijnlijk op een toename van de enzymconcentratie en niet op een verandering van de specifieke activiteit van het enzymkompleks zelf. v. In de door Molenaar en medewerkers geformuleerde hypothese over de biologische werking van vitamine E wordt uitgegaan van een bescherming van de membraan tegen vrije radicalen door het vitamine E molecuul, dat in de membraan aanwezig is als een kompleks met arachidonzuur. Aangezien eiwitten gedachtig het membraanmodel van Singer, een integraal bestanddeel uitmaken van membranen zouden vrije radicalen niet alleen met meervoudig onverzadigde vetzuren kunnen reageren maar ook met membraangebonden enzymen. Deze membraangebonden enzymen kunnen ten eerste direkt reageren met vrije radicalen, ten tweede kan hun activiteit beïnvloed worden door een primaire verandering van de vetzuursamenstelling en ten derde kunnen zij beïnvloed worden door een verstoring van de kompartmentalisatie in de cel ten gevolge van veranderingen in de vetzuursamenstelling in de membraan. Onze resultaten ondersteunen de genoemde hypothese in die zin dat de intracellulaire membranen, die een relatief hoog gehalte meervoudig onverzadigde vetzuren bevatten, het meest worden aangetast en de plasmamembraan, met weinig meervoudig onverzadigde vetzuren, het minst. In principe worden membranen met een elektronenoverdrachtsketen zoals de mitochondriale binnenmembraan en de membraan van het endoplasmatische retikulum door vitamine E beschermd en worden deze membranen bij vitamine E gebrek aangetast. Dat de mitochondriale buitenmembraan het meest wordt aangetast komt omdat deze membraan geen vitamine E bevat en tegen de binnenmembraan met elektronenover-

drachtsketen ligt. Daar de plasmamembraan geen elektronenoverdrachtsketen bezit en een hoog gehalte aan verzadigde vetzuren bevat, moet de verandering van enzymaktiviteit hier als een secundair effect worden beschouwd. Dit onderzoek heeft aangetoond dat vitamine E gebrek naast veranderingen in de membraanlipiden ook aanzienlijke veranderingen in de membraaneiwwitten tot gevolg heeft.

In this thesis an account is given of a morphological, cytochemical and biochemical investigation of a number of cellular membranes in liver parenchymal cells of the *Perla* duckling in vitamin E deficiency.

In chapter I morphological changes are described which were found in earlier investigations such as a loss of protein membrane content and a decrease of polyunsaturated fatty acids. Here weight also membrane structure also indicated that in vitamin E deficiency it is possible to form a relation on the protein moiety of membranes.

Chapter 2 contains a review of the literature relevant to the investigation: it refers to membrane, vitamin E and cell-biological phenomena in vitamin E deficiency. This chapter also contains a review of the most important membrane models as well as the most relevant hypotheses on the biological function of vitamin E.

In chapter 3 the question is answered: in which vitamin E deficiency border causing changes in the membrane lipid composition changes in membrane proteins? Is there a difference in the ultrastructure of membranes in liver parenchymal cells of control and vitamin E deficient ducklings after fixation according to a special method for the preservation of membrane proteins? It does vitamin E deficiency have an influence on the distribution of liver parenchymal cells and is expressed as: Which enzymes in the liver are influenced in vitamin E deficiency and what is the significance of the changes that appear in the functioning of the liver parenchymal cells? In a pilot study our attention was drawn to 5'-nucleotidase and glucose-6-phosphatase giving rise to the following questions: (a) At what group level is the cytochemical localization of 5'-nucleotidase and glucose-6-phosphatase in liver of control and vitamin E deficient ducklings identical? (b) Is there a biochemically detectable difference in activity of 5'-nucleotidase and glucose-6-phosphatase between liver of control and vitamin E deficient ducklings? (c) Is the influence of vitamin E deficiency on the activity of 5'-nucleotidase, localized in the plasma membrane bordering the bile canaliculi, accompanied by a change in the composition of this